

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Julia Bokajeva

**KROMOSOMAALNE EBASTABIILSUS VEISE VARAJASTES  
EMBRÜOTES**

Bakalaureusetöö

Juhendajad Olga Tšuiko

prof. Ants Kurg

TARTU 2014

# Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Kehaväline viljastamine.....	6
1.1.1. Viljastamine .....	6
1.1.2. Embrüote seleksioon .....	6
1.1.3. Embrüote säilitamine.....	7
1.2. Preimplantatsiooniline geneetiline testimine .....	8
1.2.1. Biopsia.....	8
1.2.2. Metoodika.....	9
1.2.3. Riskid .....	10
1.3. Kromosomaalne ebastabiilsus varajases embrüos .....	11
1.3.1. Meiootiline aneuploidia.....	11
1.3.2. Mosaiiksus.....	12
1.3.3. Eneseparandamise mehhanismid.....	13
1.3.4. Struktuuridefektid.....	14
1.4. <i>In vitro</i> produtseeritud veise embrüod .....	15
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	18
2.1. Töö eesmärgid .....	18
2.2. Materjal ja metoodika .....	18
2.2.1. Veise embrüo rakkude kogumine.....	18
2.2.2. Blastomeeride kogu-genoomi amplifikatsioon ja DNA puhastamine.....	18
2.2.3. Polümeraas-ahelreaktsioon (PCR) .....	18
2.2.4. Veise embrüote aberratsioonide analüüs.....	19
2.3. Tulemused.....	19
2.4. Arutelu .....	22

KOKKUVÕTE .....	25
SUMMARY .....	26
TÄNUAVALDUSED.....	28
KASUTATUD KIRJANDUS .....	29
Artiklid.....	29
Kataloogid.....	36
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	37
LISA .....	38
LIHTLITSENTS.....	39

## KASUTATUD LÜHENDID

ADO	<i>allele drop out</i>	alleeli väljalangemine
FISH	<i>fluorescence in situ hybridisation</i>	fluorestsents <i>in situ</i> hübridisatsioon
ICSI	<i>intracytoplasmic sperm injection</i>	tsütoplasmasisene spermi süstimine
IVF	<i>in vitro fertilization</i>	kehaväline viljastamine
IVP	<i>in vitro produced</i>	kehaväliselt produtseeritud
MDA	<i>multiple displacement amplification</i>	mitme nihke amplifikatsioon
PGD	<i>preimplantation genetic diagnosis</i>	preimplantatsiooniline geneetiline diagnostika
PGS	<i>preimplantation genetic screening</i>	preimplantatsiooniline geneetiline sõeluuring
PGT	<i>preimplantation genetic testing</i>	preimplantatsiooniline geneetiline testimine

## SISSEJUHATUS

Kehaväline viljastamine (*in vitro fertilization*, IVF) on tunnustatud viljatuse ravi meetod. Vaatamata sellele on protseduuri edukus suhteliselt madal ning selle põhjuseks peetakse varajastes inimese embrüotes sageli esinevat kromosoomide arvu patoloogiat ehk aneuploidiat. IVF annab võimaluse analüüsida varajase embrüo arengut väljaspool naise organismi ja selle geneetilist seisundit enne siirdamist. Embrüotes esineva kromosomaalse ebastabiilsuse uurimine annaks rohkem teadmisi selle põhjuste kohta ja võimaldaks liikuda efektiivsema viljatuse ravi suunas. Inimese embrüote uurimisega kaasnevad aga eetilised piirangud, mis ei võimalda uurida loomulikult arenevaid embrüoid. Seega puuduvad andmed *in vivo* olukorra kohta.

Praegu puudub ka mudelorganism, mis sobiks selliste uuringute läbiviimiseks, kuna teiste imetajaliikide embrüote kohta pole piisavalt informatsiooni. Vastavaid uuringuid on ennekõike takistanud kogu genoomi analüüsi võimaldavate mikrokiipide puudumine.

Veise munarakkude ja embrüote puhul saab kasutada ülegenoomset mikrokiipi, mis võimaldab analüüsida veise embrüoid kõigi 60 kromosoomi suhtes. Senini on veise embrüotest korraga analüüsitud ainult üksikuid kromosoomseid ning praegu on selgusetu, kas inimesele omane kõrge kromosoomipatoloogiate esinemissagedus esineb ka teiste imetajate varajastes embrüotes.

Bakalaureusetöö eesmärk on uurida kromosomaalset ebastabiilsust varajastes veise embrüotes ühe raku tasemel.

Märksõnad: kehaväline viljastamine (IVF), preimplantatsiooniline geneetiline testimine (PGT), aneuploidia, veis, embrüo.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Kehaväline viljastamine

Maailmas on üle 70 miljoni paari, kellel esineb probleeme laste saamisel (Ombelet *et al.*, 2008). Viljatuseks peetakse võimetust rasestuda vähemalt ühe aasta jooksul kaitsmata vahekorra puhul või kanda rasedust lõpuni (Wang, 2011). Kehaväline viljastamine on tunnustatud protseduur viljatuse raviks. Aastaks 2011 on protseduuri tulemusena sündinud umbes neli miljonit last (Zhao *et al.*, 2011). Selle ravi efektiivsus on raseduse saavutamisel tasuvam ja mõjusam kui teised (Reindollar *et al.*, 2010). Vaatamata sellele on protseduuri edukus suhteliselt madal – ainult 40% tsükleid lõpevad elusa lapse sünniga (seisukoht 2011. aastaks) (<http://nccd.cdc.gov/>). Peamiseks IVF ebaõnnestumise põhjuseks on embrüo aneuploidia, mille tõttu embrüo ei implanteeru või rasedus katkeb (Scott *et al.*, 2012).

Protseduur seisneb selles, et naiselt saadakse munarakke, mis seejärel viljastatakse *in vitro* (Austin, 1991). Hormonaalne teraapia võimaldab indutseerida mitme folliikuli üheaegse arenemise: tihti peale saadakse 10–20 munarakku ühe tsükli kohta. Mitme munaraku kättesaamine võimaldab saavutada rasestumist väiksema tsüklite arvuga (Jones, 2008).

### 1.1.1. Viljastamine

Viljastamine toimub kas traditsioonilisel või spermi süstimise meetodil. Traditsiooniline meetod eeldab, et spermid viiakse kontakti munarakuga (Vitek *et al.*, 2013). Süstimise meetodil toimub viljastamine ühe spermi sisestamisel otseselt munarakku mikromanipulatsiooni teel. Selline tehnika on saanud nimetuse tsütöplasmasisene spermi süstimine (*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI) ning oli algselt välja töötatud paaride raviks, kus mehe spermi omadused olid väga kehvad (Zhao *et al.*, 2011). Seletamatu viljatuse puhul, kui probleemi põhjusi ei ole võimalik tuvastada, võib kasutada mõlemat meetodit korraga. Sel juhul osa munarakke viljastatakse traditsioonilisel meetodil ning teine osa ICSI abil. Selline strateegia võimaldab vähendada traditsioonilise viljastamise ebaõnnestumise ohtu, olles samal ajal odavam kui ICSI meetod (Quaas ja Dokras, 2008; Vitek *et al.*, 2013).

### 1.1.2. Embrüote selektsioon

Pärast viljastamist embrüoid kultiveeritakse ning seejärel valitakse parim ja siiratakse emakasse. Tavaliselt valitakse embrüoid morfoloogia järgi (Yang *et al.*, 2012). Selektiooni kriteeriumiks on embrüo rakkude ehk blastomeeride arv (vähemalt seitse kolmandal päeval),

multituumsuse puudumine ja varane lõigustumine kaheks rakuks (kuni 27 tundi pärast viljastamist) (Sakkas *et al.*, 2001; Sakkas *et al.*, 1998). Normaalse lõigustumise kiirusega embrüod on suurema tõenäosusega ilma kromosomaalsete patoloogiateta võrreldes väga aeglaselt või väga kiiresti lõigustuvate embrüotega (Magli *et al.*, 2007; Ziebe *et al.*, 2003). Parima implanteerumise potentsiaaliga embrüote valimine võib baseeruda ka embrüo võimel jõuda blastotsüsti staadiumini 5. päeval pärast viljastumist (Gardner *et al.*, 1998). *Time-lapse* tehnoloogia võimaldab pildistada embrüot spetsiaalsete seadmetega ning jälgida tema arengut 24 tunni vältel ööpäevas. See suurendab selektsiooniks vajaliku info hulka ja kvaliteeti (Kirkegaard *et al.*, 2012). Vaatamata sellele ei ole kõik morfoloogiliselt normaalsed embrüod kromosoomi defektideta (Barbash-Hazan *et al.*, 2009).

Erijuhtudel kasutatakse geneetilist analüüsi. Kui vanematel on teada mingi pärilik geneetiline defekt, siis teostatakse preimplantatsioonilist geneetilist diagnostikat (*preimplantation genetic diagnosis*, PGD), et teha kindlaks selle defekti olemasolu embrüo genoomis. Preimplantatsioonilist geneetilist sõeluuringut (*preimplantation genetic screening*, PGS) kasutatakse aga aneuploidia tuvastamiseks embrüos, kui normaalse karüotüübiga paaridel esinevad probleemid viljakusega (Harper *et al.*, 2012). Embrüote geneetiline testimine kromosomaalsete patoloogiate suhtes võimaldab tuvastada embrüod, mis on normaalsed ning mis emakasse siiratuna oleksid võimelised implanteeruma. Seda infot kasutatakse embrüo valimisel (ASRM Practice Committee, 2008; Handyside *et al.*, 1990).

### **1.1.3. Embrüote säilitamine**

Mitme embrüo ülekandmine emakasse ühe tsükli jooksul tõstab mitmikute sündimise määra (Ledger *et al.*, 2006). Ülekandmiseks mitte valitud embrüod on võimalik krüosäilitada, sulatada ja kasutada järgnevates alamtsüklites, tõstes sellega üldise raseduse määra ühe IVF tsükli kohta (Macklon *et al.*, 2006).

Krüosäilitamine on elusrakkude säilitamine madalal temperatuuril, tavaliselt  $-196^{\circ}\text{C}$  juures vedelas lämmastikus. Inimeste reproduktiivsete kudede krüosäilitamiseks kasutatavad meetodid peavad tagama nende kudede kõrge eluvõime pärast sulatamist (Zhao *et al.*, 2011). Vaatamata sellele võib krüosäilitamise protsess kahjustada embrüoid läbi rakusiseste jääkristallide tekke (Granne *et al.*, 2008; Loutradi *et al.*, 2008).

## 1.2. Preimplantatsiooniline geneetiline testimine

Preimplantatsiooniline geneetiline testimine (*preimplantation genetic testing*, PGT) hõlmab rakulise biopsia proovi hankimist IVF tsükli tulemusena saadud arenevast munarakust või embrüost, selle geneetilise koostise hindamist ja info kasutamist implanteerimiseks parima embrüo valimisel. Seda jagatakse kaheks suunaks: diagnostika ja sõeluuring (Brezina *et al.*, 2012).

Preimplantatsiooniline geneetiline diagnostika on välja töötatud paaride jaoks, kellel esinevad pärilikud geneetilised haigused, et ennetada haigete laste sündi või raseduse katkemisi (Van der Aa *et al.*, 2013). Tavalised näidustused on mendelliku pärandumisega haigused, X-liitelised retsessiivsed haigused ja kromosomaalsed aberratsioonid (Goossens *et al.*, 2012). PGD ei ole võimalik läbi viia juhul, kui geneetiline defekt on teadmata (Brezina *et al.*, 2012).

Preimplantatsiooniline geneetiline sõeluuring on suunatud paaridele normaalsete karüotüüpidega, kellel on probleemid viljakusega vanuse, korduvate raseduste katkemiste, korduvate implantatsiooni ebaõnnestumiste või mehe viljatuse tõttu. PGS eesmärgiks on tuvastada *de novo* tekkinud kromosoomiarvupatoloogiaid (Harper *et al.*, 2012).

### 1.2.1. Biopsia

PGT jaoks on võimalik kasutada kolme tüüpi biopsiaid: polaarkeha, lõigustumise staadiumi ja blastotsüsti staadiumi biopsiat (Tabel 1). Munaraku arengu käigus meiootiliste jagunemiste tulemusena tekivad polaarkehad, mis sisaldavad naise DNA-d, mida saab kasutada biopsiaks. Pärast viljastamist algab lõigustumine ning 3. päevaks koosneb embrüo 6–8 rakust. Biopsia all mõistetakse ühe raku eemaldamist analüüsi läbiviimiseks (Brezina *et al.*, 2012). Selline biopsia on tänapäeval enimkasutatud meetod PGT-ks (Harton *et al.*, 2011). Umbes 5. päevaks on toimunud rakkude diferentseerumine sisemiseks rakumassiks, millest kujuneb embrüo, ja trofektodermiks, millest kujuneb platsenta. Analüüsiks võetakse mitu trofektodermi rakku (Brezina *et al.*, 2012). Uuringud näitavad, et trofoblastide biopsia annab paremaid tulemusi võrreldes lõigustumise staadiumis blastomeeride analüüsiga ning tõenäoliselt asendab tulevikus teisi biopsia meetodeid (Harton *et al.*, 2011).

PGT käigus hinnatakse teatud vanematel esineva geneetilise defekti olemasolu raku/rakkude genoomis PGD puhul või kontrollitakse aneuploidia esinemist PGS puhul (Handyside *et al.*, 1990; Zhao *et al.*, 2011). Pärast analüüsi valitakse üks või mitu tervet embrüot emakasse siirdamiseks. Pärast diagnoosi on õnnestunud raseduste tase ühe embrüo kohta ca 30% (Goossens *et al.*, 2012).



**Tabel 1. Biopsia tüüpide eelised ja puudused (Illumina, 2014)**

<b>Polaarkeha (Christopikou <i>et al.</i>, 2013)</b>	
<b>Eelised</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Embrüost ei eemaldata midagi.</li> <li>• Ainuke lubatud võimalus mõnedes riikides (Harton <i>et al.</i>, 2011).</li> <li>• Annab piisavalt aega analüüsiks enne siirdamist.</li> <li>• Teostatav kõikide patsientide puhul.</li> <li>• Annab informatsiooni aneuploidia päritolust.</li> </ul>	<b>Puudused</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ei tuvasta isapoolset aneuploidiat.</li> <li>• Ei tuvasta mitootilisi vigu.</li> <li>• Nõuab paljude proovide testimist ühe tsükli kohta.</li> </ul>
<b>Lõigustumise staadium</b>	
<b>Eelised</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kasutatakse kõige enam.</li> <li>• Analüüsitakse mõlema vanema poolset aneuploidiat.</li> <li>• Annab piisavalt aega analüüsiks enne siirdamist.</li> <li>• Teostatav enamuse patsientide puhul.</li> </ul>	<b>Puudused</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mosaiiksus on kõige levinum selles staadiumis.</li> <li>• Võib mõjutada embrüo eluvõimet.</li> </ul>
<b>Blastotsüsti staadium</b>	
<b>Eelised</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vähem mosaiiksust kui lõigustumise staadiumis.</li> <li>• Analüüsib mitu rakku, vähendades ebaõnnestumise riski ja tõstes tundlikkust mosaiiksuse suhtes.</li> <li>• Analüüsib mõlema vanema poolset aneuploidiat.</li> <li>• Väike või olematu mõju embrüo eluvõimele.</li> </ul>	<b>Puudused</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajaliselt surve all värske siirdamise puhul.</li> <li>• Võib olla sobimatu olukorras, kus ei moodustu palju blastotsüste.</li> </ul>

### 1.2.2. Metoodika

Metoodika baseerub kontseptsioonil, et peaaegu kõik embrüot moodustavad blastomeerid või trofoblastid on geneetiliselt identsed ning lubavad ennustada kogu embrüo genoomi analüüsides ühe või mitu biopsia teel saadud embrüo rakku (Zhao *et al.*, 2011).

PGD kasutab kahte klassikalist meetodit:

- genotüüpiseerimine monogeensete haiguste tuvastamiseks;
- fluorestsents *in situ* hübridisatsiooni (*fluorescence in situ hybridization*; FISH) analüüs kromosoomide aberratsioonide kindlaks tegemiseks või soo määramiseks, kui tegemist on X-liitelise retsessiivse haigusega (Coonen *et al.*, 1998; Van der Aa *et al.*, 2013).

Nii FISH-i kui ka genotüpiseerimise peamiseks puuduseks on lookusspetsiifilisus, mis vajab pere-spetsiifilist disainimist ja võtab palju aega. Antud meetodid ei ole ka võimelised tuvastama *de novo* tekkinud defekte kogu genoomi ulatuses (Van der Aa *et al.*, 2013). FISH analüüsi tehniliselt limiteerivaks asjaoluks on lisaks veel piiratud arv proove, mida on võimalik korraga hübridiseerida (Weier *et al.*, 1999). See tähendab, et analüüsitakse ainult teatud arvu kromosoomide ning teiste kromosoomide kohta diagnoosi ei saa (Brezina *et al.*, 2012).

Ka PGS-i läbiviimiseks kasutatakse traditsiooniliselt FISH tehnoloogiat (Harper ja Sengupta, 2012). Suur arv randomiseeritud kliinilisi uuringuid ei näidanud aga IVF edukuse paranemist FISH-põhineva PGS kasutamisel (Mastenbroek *et al.*, 2011). FISH võimaldab analüüsida väheseid kromosoomide, mis on küll kõige sagedamini täheldatud raseduste katkemistel ja aneuploidse genoomiga laste sündimisel, aga ei pea olema kõige olulisemad varajaste embrüote jaoks. See võib põhjustada embrüote siirdamist, milles esineb aneuploidne kromosoom, mida ei olnud eelnevalt analüüsitud (Fiorentino *et al.*, 2014).

Tänapäeval on välja töötatud meetodid, mis võimaldavad detekteerida nii päranduvaid kui ka *de novo* tekkinud DNA koopiarvu variatsioone üle kõigi 24 kromosoomi. Kõik need meetodid on väga täpsed, aga enamus vajab kogu-genoomi amplifikatsiooni ning on seetõttu tundlik artefaktide ja müra suhtes (Handyside, 2013). Need meetodid asendavad tõenäoliselt järk-järgult klassikalisi (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2011; Treff *et al.*, 2011). Nende puuduseks on aga kõrgem hind ja analüüsi kestus (Van der Aa *et al.*, 2013).

### **1.2.3. Riskid**

PGT-ga seotud võimalikud riskid on embrüo kahjustused biopsia käigus ja vale diagnoosimine.

Embrüo kahjustused on seotud sellega, et embrüolt võetakse ära üks või mitu rakku. Kui rakud võetakse lõigustumise staadiumis, siis kõik blastomeerid on veel totipotentsed ehk diferentseerumist ei ole veel toimunud ja iga rakk on võimeline edasi arenema tervikorganismiks (Hassold *et al.*, 1980). Teoreetiliselt, see võib aeglustada embrüo arengut, aga ei tohiks põhjustada anatoomilisi defekte.

Vale diagnoosimine on tingitud meetodite tehnilistest piirangutest, inimeste vigadest ja embrüo mosaiiksusest (Brezina *et al.*, 2012). Mosaiiksuse tõttu võib lõigustumise staadiumis analüüsitud rakk mitte iseloomustada embrüo kromosoomide seisundit (Harton *et al.*, 2011). Uuringud on näidanud, et mosaiiksuse tase on oluliselt madalam viiendaks päevaks pärast

viljastamist. Vaatamata sellele esineb ka blastotsüsti staadiumis madal dissonantsi tase trofektodermi ja sisemise rakumassi vahel. Seega säilib vale diagnoosimise risk isegi parimate meetodite kasutamisel (Brezina *et al.*, 2012).

### **1.3. Kromosomaalne ebastabiilsus varajases embrüos**

Mitmed uurimistööd näitasid, et inimese munarakkude ja varajaste embrüote tähelepanuväärseks iseärasuseks on väga sagedased blastomeeride kromosomaalsed aberratsioonid (Mertzanidou *et al.*, 2013; Robberecht *et al.*, 2010). Ligikaudu 70% embrüotes esineb kromosoomipatoloogia, kusjuures kromosoomihaiguseid esineb ainult <1% vastsündinutest. Seega esinevad arengu käigus protsessid, mis välistavad haige lapse sünni, kuna kromosoomipatoloogiaga embrüo ei implanteeru või rasedus katkeb (Vanneste *et al.*, 2011). Arvatakse, et kromosomaalsete defektidega embrüod on küll võimelised lõigustuma, aga enamik on elimineeritud edasise arengu käigus (Plachot *et al.*, 1987). Varajase embrüogeneesi kromosomaalse ebastabiilsuse olemuse ja esinemissageduse uurimine annab teadmisi inimese viljatuse põhjuste kohta (Vanneste *et al.*, 2009).

Kromosomaalset ebastabiilsust iseloomustab kõrgendatud kromosoomide või kromosoomi osade duplikatsioonide või deletsioonide tase rakutsükli kohta, mis viib rakkude vahelise varieeruvuseni. Selline ebastabiilsus esineb varajastes embrüotes ja meenutab kromosomaalset ebastabiilsust inimese vähkides (Geigl *et al.*, 2008).

*In vitro* uuritud kromosomaalne ebastabiilsus esineb tõenäoliselt ka *in vivo*, kuna mitte rohkem kui 30% viljastumistest lõpevad elussündimisega (Macklon *et al.*, 2002), rohkem kui 50% iseeneslikke aborte on põhjustatud kromosomaalse ebastabiilsuse poolt (Benkhalifa *et al.*, 2005; Fritz *et al.*, 2001) ning vastsündinutes on tihti täheldatud terminaalset deletsiooni, duplikatsiooni, isokromosoomi ja mosaiiksust (Schinzel, 2001). Teiste imetajate (hiir, veis, lammas) embrüotega teostatud uuringud näitavad, et aneuploidia esineb *in vitro* sagedamini kui *in vivo* (Coppola *et al.*, 2007). See tähendab, et inimese IVF embrüotes täheldatud aneuploidia tase on ilmselt suurem kui loomulikult arenevates embrüotes, mis ei ole uurimiseks kättesaadavad (Barbash-Hazan *et al.*, 2009).

#### **1.3.1. Meiootiline aneuploidia**

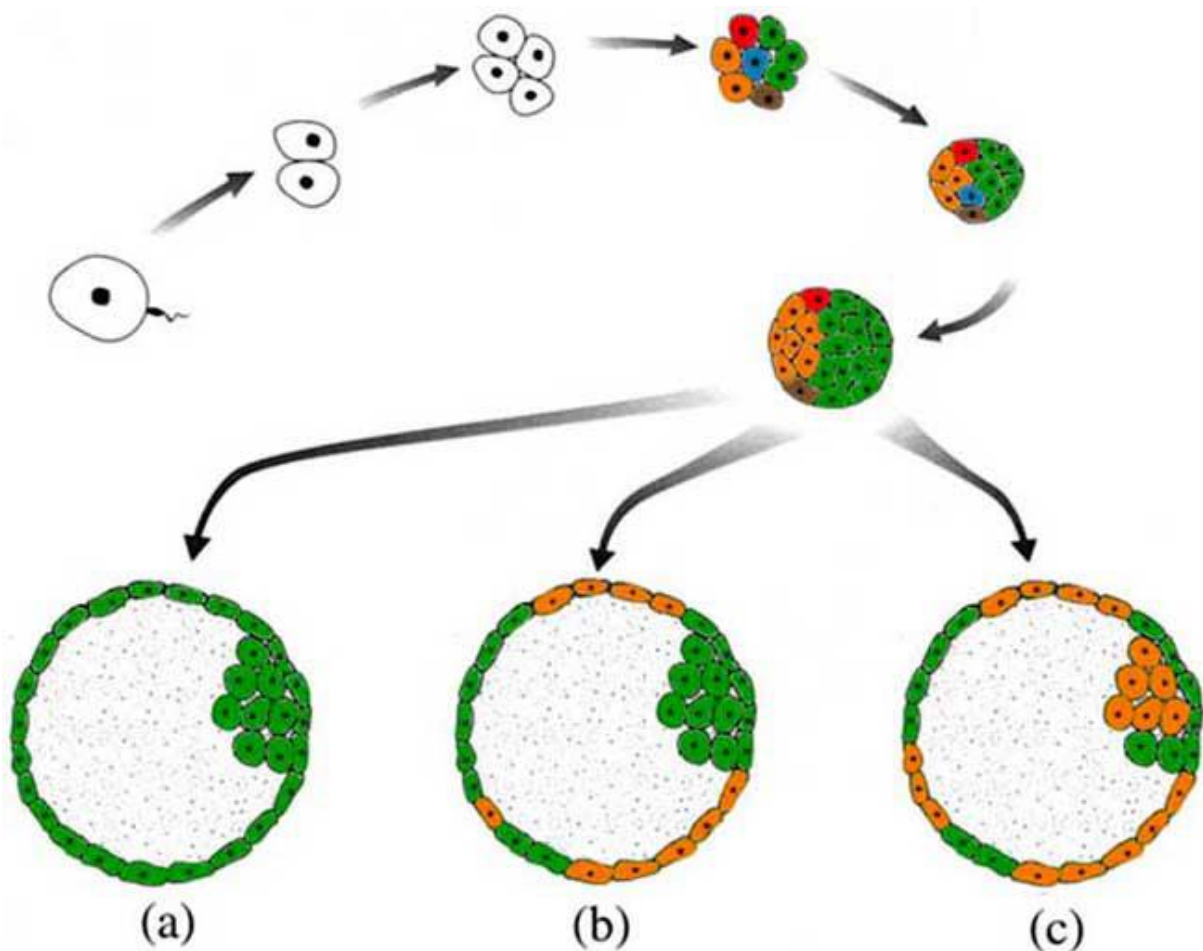
Embrüote kromosoomide defektide tekkemehhanismid on väga erinevad. Ligikaudu kolmandikul juhtudel esineb embrüo kõikides rakkudes sama kromosoomiarvu patoloogia ehk aneuploidia. See tähendab, et kromosoomide arv rakus ei ole haploidse arvu korrutis

(Nagaoka *et al.*, 2012). Selline aneuploidia on meiootilise päritoluga ning esineb juba munarakus või seemnerakus. Kromosoomide lahknemise häired ja kromosoomipatoloogiad tekivad ennekõike munarakkude meioosi I jagunemise vigade tulemusena, seega esineb aneuploidiaid munarakkudes sagedamini kui seemnerakkudes (Hassold ja Hunt, 2001). Munarakkudes esineva aneuploidia sagedus varieerub 2,8%-st kuni 65%-ni, kasvades naise vananemisega (Beck-Fruchter *et al.*, 2014; Kuliev *et al.*, 2003). See on tõenäoliselt pikaajalise kromosoomide aresti tulemus esimese meiootilise jagunemise käigus (Capalbo *et al.*, 2013).

### **1.3.2. Mosaiiksus**

Lisaks aneuploidiale võib embrüotes esineda mosaiiksus, mille korral tekivad kromosoomide lahknemise häired blastomeeride mitootiliste rakujagunemiste käigus (Robberecht *et al.*, 2010). Sellisel juhul esineb kromosoomide arvu defekt ainult nendes embrüo rakkudes, mis on ühe ja sama raku järglased. Tulemuseks on mosaiikne embrüo, mis koosneb kas diploidsetest ja aneuploidsetest rakkudest või ainult aneuploidsetest rakkudest, kus erinevates rakkudes on erinevad aneuploidised kromosoomid (Vanneste *et al.*, 2009).

Mitootiliste vigade esinemine on sagedasem esimese kolme lõigustumise käigus pärast viljastumist ning väheneb järgnevates arengustaadiumites. See on tingitud aneuploidsete rakkude vastu suunatud valikust või eneseparandamise mehhanismidest. Kui mosaiikse embrüo blastomeeridest on vähemalt 2/3 normaalseid, siis võib temast saada kromosomaalselt normaalne loode (Joonis 1) (Li *et al.*, 2005b; Robberecht *et al.*, 2010). Samuti võib toimuda kromosomaalsete aberratsioonide edasine omandamine järgnevates arengustaadiumites (Frumkin *et al.*, 2008). Seega lisaks selektsioonile kromosomaalselt ebanormaalsete embrüote vastu toimib veel valik raku tasemel ebanormaalsete blastomeeride suhtes (Vanneste *et al.*, 2009). Valik toimib nii enne kui ka pärast embrüo implanteerumist (Barbash-Hazan *et al.*, 2009).



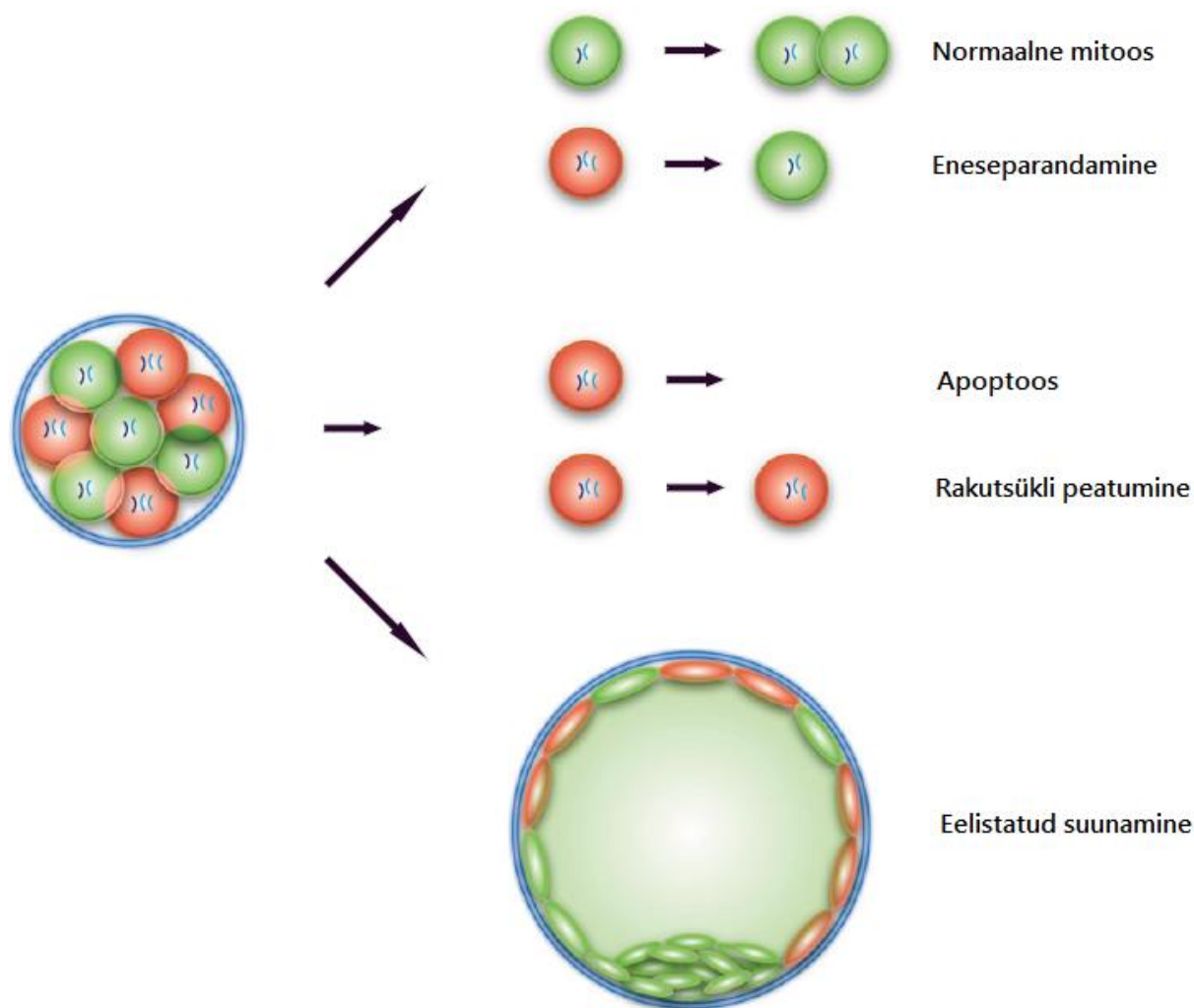
**Joonis 1. Inimese embrüo areng blastotsüsti staadiumini** (Robberecht *et al.*, 2010). Erinevad värvid iseloomustavad mosaiiksust, kus rohelised on normaalsed diploidsed blastomeerid ning oranžid, punased, sinised ja pruunid on blastomeerid, kus esinevad mitootilise päritoluga kromosomaalsed defektid. Kui embrüo jõuab blastotsüsti staadiumini, siis (a) võivad defektsed rakud minna kaotsi negatiivse selektsiooni tõttu; (b) segregeeruda trofektodermi, mis põhjustab platsentaarset mosaiiksust; või (c) neid leidub nii sisemises rakumassis kui trofektodermis, mis põhjustab mosaiiksust ka embrüos.

### 1.3.3. Eneseparandamise mehhanismid

Eneseparandamine toimub umbes 20% aneuploidsetes embrüotes ja on tõenäolisem arengu käigus blastotsüstiks kui hilisematel staadiumitel (Allan *et al.*, 2004; Barbash-Hazan *et al.*, 2009).

Eneseparandamise mehhanismide hulka kuuluvad rakutsükli peatumine, apoptoos ehk programmeeritud rakusurm, eneseparandamine ehk üleliigse kromosoomi eemaldamine või puuduva kromosoomi asendamine paaritu kromosoomi duplikatsioon teel ning eelistatud suunamine näiteks trofektodermi moodustamiseks (Joonis 2) (Mantikou *et al.*, 2012). Kui

ebanormaalsete rakkude arv ületab kindla künnise, siis viib see kogu embrüo degradeerumiseni (Evsikov ja Verlinsky, 1998).



**Joonis 2. Mitootilise aneuploidia saatus** (Mantikou *et al.*, 2012), kohandatud.

### 1.3.4. Struktuuridefektid

Embrüo rakkudes võivad esineda ka kromosoomide struktuuridefektid, mille korral esinevad kromosoomi teatud piirkodades DNA deletsioonid või duplikatsioonid. Kuigi viljastatud munarakud on enamuses kromosomaalselt balansseeritud, esinevad üle 50% embrüotes lõigustumise staadiumis segmentaalsed ebastabiilsused kromosoomide otstes. Terminaalseid ebastabiilsusi võib klassifitseerida kui lihtsaid ja kompleksseid. Lihtsate hulka kuuluvad terminaalsed deletsioonid, duplikatsioonid ja amplifikatsioonid. Kompleksseteks võib pidada terminaalseid ebastabiilsusi, millega kaasneb segmentaalne aneuploidia. Sagedased on ka murdepunktid tsentromeeri piirkonnas, mis võivad põhjustada terve öla deletsiooni või duplikatsiooni (Vanneste *et al.*, 2009). Osades rakkudes *de novo* tekkinud DNA koopiarvu muutused võivad esineda genoomi piirkondades, mis võivad sisaldada gene. Kui aneuploidia

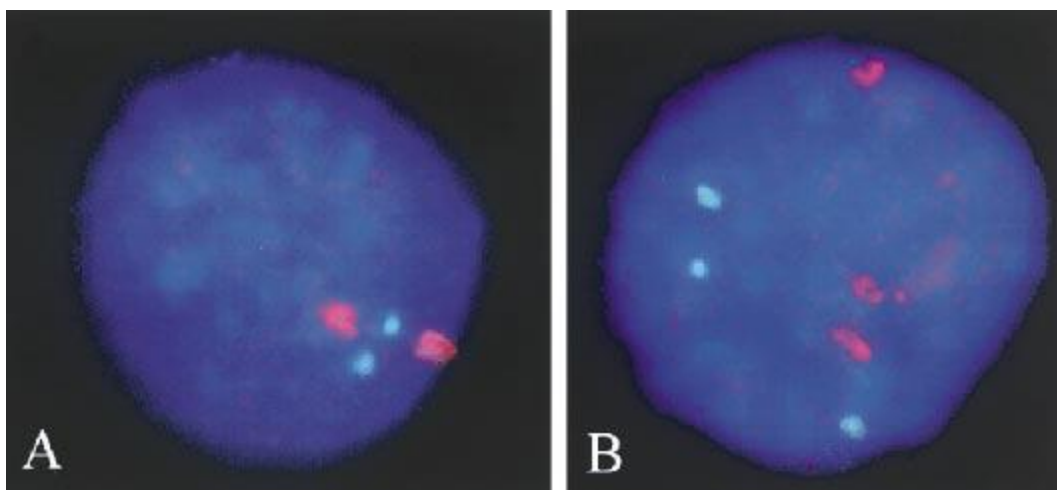
ja mosaiiksus tekivad pärast kromosoomide lahknemishäireid, siis DNA koopiaarvu muutused tekivad peamiselt DNA replikatsiooni probleemide tõttu (Robberecht *et al.*, 2010). Kompleksse terminaalse deletsiooniga kaasneb tihti ülejäänud kromosoomisegmentide duplikatsioon. Kui selline ebastabiilsus on tuvastatud ühes blastomeeris, siis õde-blastomeeris on sageli tuvastatud vastava deleteeritud segmendi duplikatsioon, kusjuures veel üks õde-blastomeer on monosoomne vigastatud kromosoomi suhtes. Lihtsad ja kompleksed ebastabiilsused võivad eksisteerida koos ühe embrüo ulatuses erinevates kromosoomides (Vanneste *et al.*, 2009).

#### **1.4. *In vitro* produtseeritud veise embrüod**

Veise genoom on pakitud 60 kromosoomi, nendest 58 on autosoomid ning viimase paari moodustavad sugukromosoomid X ja Y (Elsik *et al.*, 2009). Inimese genoom on organisatsiooni poolest sarnasem veise genoomile kui hiire omale, kuna enamik veise kromosoomide on eelkõige vastavuses inimese genoomiga, kuigi mitme ümberkorraldusega (Everts-van der Wind *et al.*, 2005).

Tingimused, milledes toimub kehaväline veise munarakkude küpsemine ja viljastamine ning sügooti ja embrüo kasvatamine, mõjutavad embrüo rakkude arvu, morfoloogiat ja eluvõimet pärast siirdamist. Mõju avaldub ka platsenta moodustumisele ja embrüo edasisele arengule (Farin ja Farin, 1995).

Eriti veistel on sagedased varased implantatsioonijärgsed arengu peatumine ja abort (Li *et al.*, 2005a). Enamus embrüo surmasid esineb esimese ja teise tiinuse kuu vahel, siis kui toimub platsenta kinnitumine (Heyman *et al.*, 2002). Arenguhäirete tekkel võivad kaasa aidata kromosomaalsed ebastabiilsused (Burgoyne *et al.*, 1991). Sellised defektid esinevad kuni 70% *in vitro* ja ca 25% *in vivo* produtseeritud veise embrüotest ning põhjustavad kas täielikku või osalist polüploidisust (mosaiiksust) (Viuff *et al.*, 2000). Mosaiiksetes embrüotes on 70% rakkudest siiski diploidsed; ülejäänud 30% rakkudest esineb tri-, tetra-, harvem heksaploidisus (Li *et al.*, 2005a). Mosaiiksuse korral on sagedaseim diploidisus-triploidisus ning polüploidisuse puhul triploidisus (Joonis 3).



**Joonis 3. Veise 6. ja 7. kromosoomi FISH analüüs** (Viuff *et al.*, 2000). 6. kromosoom on märgitud punase ja 7. kromosoom rohelise fluorofooriga. A) Diploidne blastomeer, mis annab kaks signaali mõlemalt kromosoomilt. B) Triploidne blastomeer, mis annab kolm signaali igalt kromosoomilt.

Ulatuslikku ja pikaajalist mõju blastotsüsti arengule ja tulevase embrüo rakkude arvule omab esimese lõigustumise aeg pärast viljastamist (Yadav *et al.*, 1993). Seega polüploidsus on tõenäoliselt peamine põhjus, miks sellised embrüod arenevad aeglaselt ning harva jõuavad blastotsüsti staadiumini (Holm *et al.*, 1998; Viuff *et al.*, 2000).

Täielik või osaline polüploidsus on sagedased alates embrüo teisest elupäevast. Täielik polüploidsus esineb alla 10% embrüotest ning ilmselt kestab 8-raku staadiumini ja hilisematel arengustaadiumitel ei esine. See võib olla tingitud sellest, et ebanormaalsed embrüod elimineeruvad alates teisest elupäevast ning kaovad täiesti enne embrüonaalse genoomi aktiveerimist veistel. Mosaiiksete embrüote puhul sellist seost arengustaadiumiga ei ole täheldatud (De Sousa *et al.*, 1998; Viuff *et al.*, 2000). See tähendab, et kromosoomidefektid, mis hõlmavad kogu kromosoomi komplekti on vastuolus embrüo arenguga. Polüploidsus võib tekkida gametogeneesi või IVF käigus. Samuti võib polüploidsuse teket stimuleerida rakkude kultiveerimine *in vitro* (Viuff *et al.*, 2000). Tekkesagedus varieerub ka liikide vahel (Lechniak *et al.*, 1996).

Mosaiiksus tekib tõenäoliselt kas ebanormaalse viljastamise käigus, näiteks polüspermia puhul, või embrüo rakkude kultiveerimisel *in vitro* (Handyside ja Delhanty, 1997; Viuff *et al.*, 2000). Viimasel juhul võivad rakkudes tekitatud kõrvalekalded põhjustada ebanormaalselt kromosoomide eraldamist juba esimese lõigustumise käigus. Sage postsügootsete kromosomaalsete defektide teke võib olla tingitud rakutsükli kontrollpunktide puudusest enne veise genoomi aktiveerimist. See aga seletab ainult väikese osa tekkivast mosaiiksusest. Selle



tekkimisel võivad olulist rolli omada ka rakkude kultiveerimistingimused, kuna *in vivo* arenenud embrüotel on mosaiiksuse tase tunduvalt väiksem (Viuff *et al.*, 2000). Samas on tõestatud, et kultiveerimisega kaasnevad füüsilised tegurid ei suurenda polüploidisuse taset jänese embrüotes (Schumacher *et al.*, 1998).

Kromosomaalse mosaiiksuse mõju veise embrüo arengule on veel teadmata. Mosaiiksuse taseme kasv neljandast elupäevast kuni kaheksandani IVP süsteemis, mis efektiivselt suurendas tiinestumist, näitab, et see defekt ei ole oluline tiineks jäämiseks (Viuff *et al.*, 1999).

Teooriad, kuidas ebanormaalsete blastomeeridega embrüost võib areneda normaalne loode, on järgmised.

1. Apoptoos või valik ühe rakuliini vastu ei pea olema embrüole letaalne, kui esineb normaalne südamik (Jurisicova *et al.*, 1996).
2. Tetraploidsed blastomeerid on hiirtel suunatud trofektodermi (James *et al.*, 1995).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Töö eesmärgiks on analüüsida veise 8-rakulises staadiumis olevaid embrüoid kromosoomidefektide suhtes.

### 2.2. Materjal ja metoodika

#### 2.2.1. Veise embrüo rakkude kogumine

Käesolevas töös kasutati Rakvere Lihakombinaadist saadud veise munasarjadest eraldatud munarakke, mis viljastati doonorpulli spermaga ning analüüsiti kolm 8-rakulises staadiumis veise embrüot. Blastomeeride eraldamiseks ja üksikrakkude saamiseks kasutati  $\text{Ca}^{2+}$  ja  $\text{Mg}^{2+}$  vaba söödet ning rakke koguti ühe kaupa mikromanipulaatori abil. Embrüo biopsia viidi läbi prof. Ülle Jaakma töögrupi spetsialistide poolt (Eesti Maaülikool, Veterinaarmeditsiini- ja Loomakasvatuse Instituut, Tartu).

#### 2.2.2. Blastomeeride kogu-genoomi amplifikatsioon ja DNA puhastamine

Blastomeeride DNA amplifitseeriti MDA (*multiple displacement amplification*, MDA) meetodiga kasutades *Repli-G Single Cell* kit'i (Qiagen). Amplifitseerunud DNA puhastati kommertsiaalse *High Pure PCR Product Purification* kit'iga (Roche) vastavalt tootja poolt koostatud juhendile.

MDA ehk mitme nihke amplifikatsioon on kogu-genoomi amplifikatsiooni tehnoloogia. Denatureeritud DNA-le seonduvad juhuslikud heksameersed praimerid ning toimub nende pikendamine. Süntees toimub konstantsel temperatuuril 30°C juures ning selle viib läbi polümeraas  $\phi 29$ , millel on *proofreading* ehk 3'→5' eksonukleasne aktiivsus. Sünteesi käigus liigub polümeraas piki matriitsahela ja nihutab ees oleva komplementaarse ahela nii, et selle ots ei ole enam matriitsiga seotud. Vabale otsale seonduvad praimerid ja sellest saab omaette matriitsahel. Sellise amplifikatsiooni tulemuseks on pikad (2–70 kb) DNA fragmendid (<http://www.qiagen.com/>).

#### 2.2.3. Polümeraas-ahelreaktsioon (PCR)

MDA kvaliteeti määrati polümeraas-ahelreaktsiooni abil. PCR reaktsiooni jaoks kasutati veise 6., X- ja Y-kromosoomi spetsiifilisi praimereid. Praimerite järjestused on toodud lisas. PCR

läbi viimiseks kasutati FIREPol® DNA *Polymerase* reagente (FIREPol® DNA polümeraas 5 u/µl, Solis BioDyne; 10x reaktsioonipuhver; 25 mM MgCl<sub>2</sub>, Thermo Fischer Scientific) ja nukleotiidide segu (dNTP Mix, 2 mM, Thermo Fischer Scientific). Amplifitseerimiseks kasutati 50 ng veise DNA-d, kogu reaktsiooni ruumala oli 20 µl. Positiivseks kontrolliks veise DNA asemel kasutati inimese DNA-d ja negatiivseks vett. Amplifitseerimisel kasutati masinat PTC-200 Thermo Cyclor (GMI Inc.) ning järgmist programmi:

- DNA algdenaturatsioon 95°C juures 5 min;
- 35 tsüklit:
  - denaturatsioon 95°C juures 30s,
  - praimerite seondumine 55°C juures 30s,
  - süntees 72°C juures 30s;
- lõppsüntees 72°C juures 10 min.

PCR produktide kvaliteeti kontrolliti 1,5% agarosgeelil, kasutades markerit O'RangeRuler™ 20 bp DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific).

#### **2.2.4. Veise embrüote aberratsioonide analüüs**

Amplifitseeritud ja kontrollitud veise embrüorakkude DNA saadeti prof. Joris Vermeesch laborisse (Inimese Inimgeneetika Keskus, Leuven Katoliku Ülikool, Leuven, Belgia) edasiseks kiibianalüüsiks. Kõik uuritavad DNA-d analüüsiti Illumina Inc. (San Diego, CA, USA), Infinium II tehnoloogia abil veise BovineSNP50 kogu genoomi BeadChip kiipidel (Illumina), järgides tootjafirma poolt välja töötatud standardprotokolle ja kasutades tootja poolt valmistatud reaktiivide komplekte. Genotüpiseerimistulemused analüüsisid projekti koostööpartnerid Belgias, kasutades nende poolt välja töötatud programmi.

### **2.3. Tulemused**

Käesolevas töös uuriti kolm veise embrüoid kromosoomipatoloogia suhtes. Analüüs teostati ühe raku tasemel. Kolme 8-rakulise veise embrüo blastomeeride eraldamisel saadi kokku 23 blastomeeri ning üks blastomeer läks kaotsi.

PCR ja järgnev geelelektroforees näitasid, et blastomeeride kogu-genoomi amplifikatsioon kasutades MDA meetodit õnnestus 15 raku (65%) puhul. PCR/geelelektroforeesi tulemused on toodud Tabelis 2. Blastomeeri genoomi amplifitseerimine loeti õnnestunuks, kui geelis oli nähtav vähemalt üks kontrollitavatest kromosoomidest (6., X või Y). Negatiivne (vesi) ja

positiivne (inimese DNA) kontrollid olid geelil PCR produktidest vabad, mis tähendab, et proovides oli tegemist puhta veise DNA-ga.

**Tabel 2. PCR/geelelektroforeesi tulemused.** E1–E3 tähistavad embrüoid, B1–B8 tähistavad blastomeere. „+“ tähendab, et PCR produkt oli geeli peal nähtav; „–“ tähendab, et PCR produkt ei olnud geeli peal nähtav. Esimene märk tähistab 6., teine X- ja kolmas Y-kromosoomi. Tühi lahter näitab, et rakk oli kaotatud biopsia käigus.

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
E1	+/+/-	+/+/-	-/-/-	+/+/-	+/+/-	+/+/-	-/-/-	+/+/-
E2	+/+/+	+/-/-	+/-/+	-/-/-	-/-/-	+/+/+	-/-/-	
E3	+/+/+	-/-/-	+/-/+	+/-/+	+/-/+	-/-/-	+/-/+	-/-/-

Vaatamata PCR/geelelektroforeesi andmetele kasutati kiibianalüüsiks kõik 23 blastomeeri DNA-d. Tulemused on toodud joonisel 4. Kiibianalüüsi teostamisel keskenduti rohkem suurte kromosomaalsete aberratsioonide leidmisele. Kiibianalüüs näitas, et amplifitseeritud 15 (65%) blastomeerist kaks (9%) ei andnud analüüsil andmeid. Andmed puuduvad enamasti nendest blastomeeridest, mis PCR/geelelektroforeesi läbiviimisel ei andnud nähtavat produkti (Tabel 2). Vaatamata sellele, et E1B6 ja E2B1 PCR produktid olid geelis nähtavad, ei olnud kiibianalüüsi võimalik läbi viia andmete halva kvaliteedi tõttu. E1B7 analüüs ei õnnestunud nõrga signaali tõttu ning see tulemus langeb kokku PCR tulemusega, mis näitas, et E1B7 amplifikatsiooni ei toimunud.

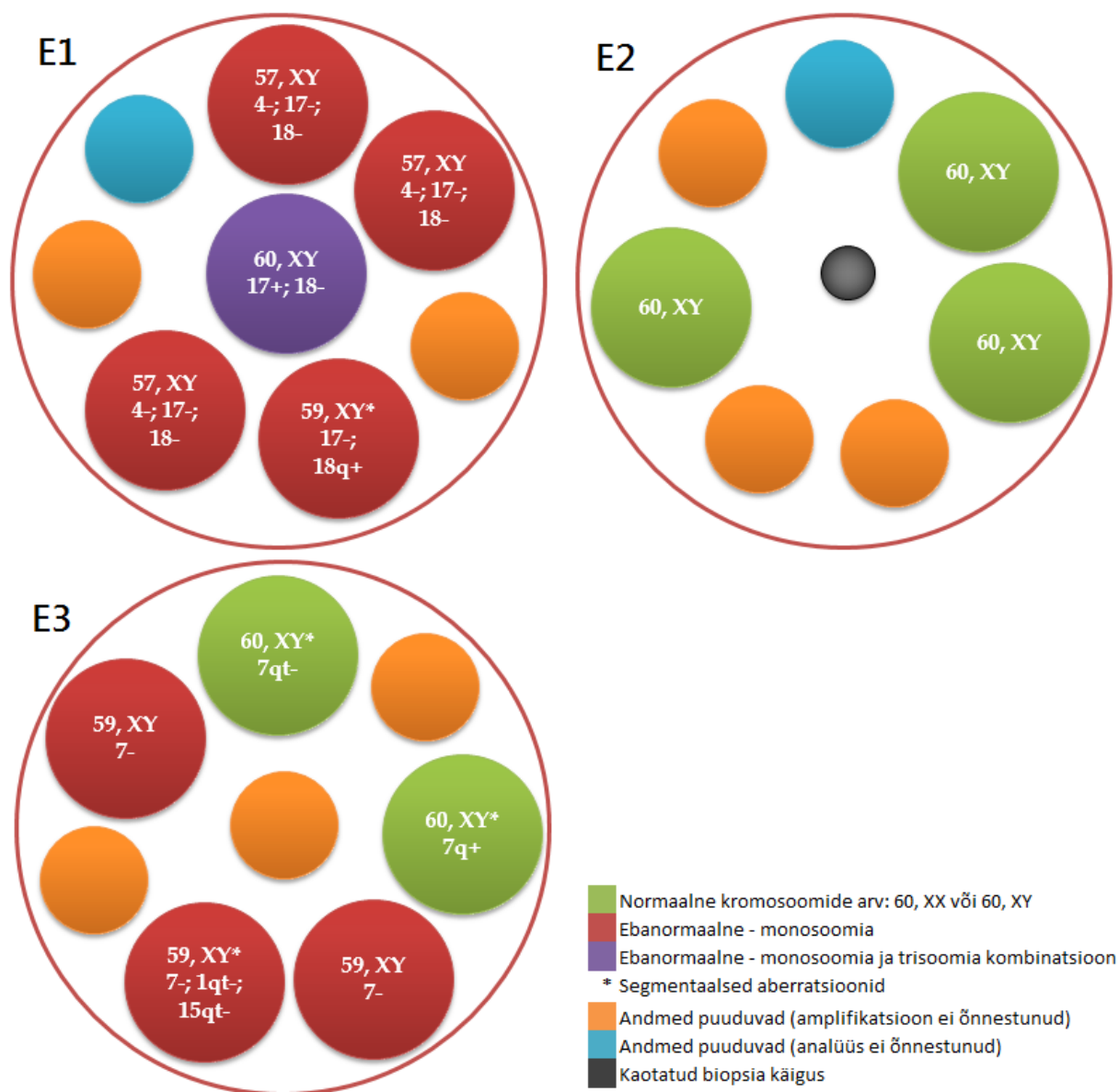
PCR/geelelektroforeesi tulemused ei lange kokku kiibianalüüsi tulemustega kuue (26%) blastomeeri X-kromosoomi suhtes – geelis ei olnud PCR produkti näha, aga kiibianalüüs näitas, et kromosoom on nendes rakkudes ikkagi olemas. Sarnane olukord on ka Y-kromosoomiga: PCR/geelelektroforeesi tulemuste järgi puudub antud kromosoom seitsmest (30%) rakust, samas kui kiibianalüüsi järgi on kõik embrüod isased ning kõikides rakkudes esineb Y-kromosoom.

Kolmest embrüost ainult ühe embrüo (E2) analüüsitud blastomeerid olid diploidsed ja ilma patoloogiateta. Teistes embrüotes (E1 ja E3) esines mosaiiksus ja segmentaalsed aberratsioonid.

Diploidseid blastomeere oli kuus (26%), nendest ainult kolm (13%) ei sisaldanud kromosoomidefekte. Üks (4%) blastomeer sisaldas nii monosoomiat kui ka trisoomiat, mis balansseerivad üksteist ning tekitavad näilist diploidsust. Ülejäänud kaks (9%) sisaldasid ühe kromosoomi aberratsioone.

Aneuploidseid blastomeere oli seitse (30%), nendest neli (17%) sisaldasid ühe kromosoomi monosoomiat ja kolm (13%) sisaldasid kolme kromosoomi monosoomiat.

Segmentaalsed aberratsioonid esinesid neljas (17%) blastomeeris, kusjuures sama embrüo kahes rakus esinesid terminaalsed deletsioonid. Kahes rakus oli leitud kromosoomi pika õla duplikatsioon.



**Joonis 4. Embrüo 1, 2 ja 3 kiibianalüüsi tulemused.** E1-E3 tähistavad embrüoid. Ülemine number tähistab kromosoomide arvu analüüsitud blastomeeris. XY näitab, et tegemist on pulliga. 4-, 7-, 17- ja 18- näitavad, et üks vastava kromosoomi koopia rakus puudub (monosoomia), samas kui 17+ näitab, et rakus on lisa kromosoom (trisoomia). 7q+ ja 18q+ näitavad, et vastaval kromosoomil esineb pika õla duplikatsioon. 1qt-, 7qt- ja 15qt- tähistavad vastava kromosoomi pika õla telomeeri deletsiooni.

## 2.4. Arutelu

Uuringus olid analüüsitud lõigustumise staadiumis olevad embrüod ning kromosomaalsete patoloogiatega embrüote esinemissagedus oli 67%, mis vastab varem veiste embrüotega teostatud uuringu tulemustele (Viuff *et al.*, 2000) ning näitab, et selles arengustaadiumis on kromosoomidefektid tavaline nähtus. Selline kromosomaalse ebastabiilsuse tase vastab ka inimese IVF embrüotes varem kirjeldatule (Mertzanidou *et al.*, 2013; Vanneste *et al.*, 2009).

Uuringu käigus ei õnnestunud amplifitseerida suurt osa blastomeere. Selle põhjuseks võib olla algselt lagunenenud DNA või MDA meetodi tõrked, kuna see ei ole kõige tõhusam meetod kogu-genoomi amplifikatsiooniks. Samas, kuna paremat meetodit praegu ei ole, siis on antud meetod ikkagi kõige sobilikum DNA mikrokiipide analüüsiks ettevalmistatava DNA paljundamisel. Kahe blastomeeri puhul (E1B6 ja E2B1) oli PCR produkt geeli peal nähtav, aga kiibianalüüs ei andnud tulemusi, mis viitab sellele, et kiibireaktsioon ei õnnestunud ning seetõttu tekkis analüüsil liiga palju müra ja kiibisignaale ei olnud võimalik eristada.

Kuigi tähelepanu pöörati rohkem suurtele kromosomaalsetele aberratsioonidele, saab PCR ja kiibianalüüsi tulemuste võrdlemisel järeldada, et uuritud embrüotes võiksid esineda väikesed mikrosatelliidi piirkondade deletsioonid X- ja Y-kromosoomis. Sellele viitab asjaolu, et kõik kiibil analüüsitud rakud sisaldasid XY kromosoomide paari, samas kui paljude rakkude puhul ei õnnestunud PCR läbiviimisel mikrosatelliitsete praimeritega saada amplifikatsiooniprodukte. Ka 6. kromosoomis esinesid kordusjärjestused, aga antud juhul ei kasutatud mikrosatelliit markereid ning amplifikatsiooni läbiviimine õnnestus. See on vastavuses varem läbiviidud uuringuga mikrosatelliitsete markerite suhtes (Renwick *et al.*, 2007), kus lõigustumise staadiumis olevate inimese embrüote blastomeeride genoomi amplifitseeriti MDA meetodil ja analüüsiti mikrosatelliitsete markerite abil. Uuringu tulemused näitasid, et ühe markeri poolt ennustatud aneuploidia võib tegelikult olla antud kromosoomipiirkonna aberratsioon või alleeli väljalangemine (*allele drop out*, ADO) MDA käigus, kui teised samal kromosoomil paiknevad markerid ennustavad diploidsust. ADO tähendab, et osa alleele ei õnnestunud amplifitseerida.

Ühe embrüo analüüsitud blastomeerid olid diploidsed ja ei sisaldanud kromosoomide patoloogiaid. Vaatamata sellele ei saa järeldada, et ka kogu embrüo oli geneetiliste defektideta. Antud juhul oli võimalik analüüsida ainult kolm blastomeeri, kuna üks blastomeer kaotati embrüo biopsia käigus, ühe blastomeeri kiibisignaali oli väga nõrk ning kolme blastomeeri puhul ei saadud üldse kiibisignaali. Täiesti võimalik, et ka see embrüo oli mosaiikne, kuigi tõestust selle kohta ei ole.

Embrüote mosaiiksus viitab sellele, et blastomeerides esinev aneuploidia on mitootilise päritoluga, kuna mitte kõikides ühe embrüo blastomeerides ei hõlma aneuploidia samu kromosoomi. Sama embrüo piires aga esinevad rakud, kus puuduvad samad kromosoomid. Tõenäoliselt nad kuuluvad ühte rakuliini. Ühe embrüo (E1) puhul esines ühes rakus 17. kromosoomi trisoomia, kusjuures teistes rakkudes oli selle kromosoomi monosoomia. Seega võib oletada, et mitootilise jagunemise käigus segregerus ühte rakku kolm kromosoomi koopiat ja teisse ainult üks. Selle embrüo enamik rakke on mosaiiksed ning tõenäoliselt ei olnud ta eluvõimeline. Teises mosaiikses embrüos (E3) aga esineb kaks diploidset blastomeeri, mis jätab võimaluse, et embrüo oleks võinud areneda edasi blastotsüstiks juhul, kui amplifitseerimata genoomiga blastomeerid olid diploidsed.

Mosaiiksetes embrüotes leiti ka kromosoomide segmentaalseid aberratsioone. Nad võivad iseloomustada kromosoomides esinevaid defekte (deletsioone ja duplikatsioone) või olla põhjustatud ADO poolt, mis oli ka varem kirjeldatud MDA puhul (Macauley ja Voet, 2014; Renwick *et al.*, 2007).

Kõige olulisemaks mehhanismiks aneuploidiatest lahti saamiseks on defektsete embrüote ja blastomeeride vastu suunatud valik. Kui embrüos esinevad kromosoomipatoloogiad, siis tõenäoliselt selline embrüo ei implanteeru või rasedus katkeb varases staadiumis, kuna embrüo ei ole eluvõimeline. See on kõige olulisem viis defektidest vabanemiseks ning sellest on ka osaliselt tingitud viljatus. Samas on arvatud, et blastomeeride suunatud valik ei pea olema embrüole letaalne (Jurisicova *et al.*, 1996). Kui defektsete rakkude osakaal ei ole suur, siis nende programmeeritud surm (apoptoos) küll aeglustaks embrüo arengut, aga lõpuks peaks välja kujunema normaalne embrüo. See on üks embrüo eneseerandamise mehhanismidest. Samuti võib toimuda defektse raku paljunemistsükli peatumine ning tulemuseks nende rakkude osakaal väheneb niivõrd, et embrüo koosneb ainult normaalsetest rakkudest. Ka defektsete rakkude suunamine trofektodermi viib selleni, et sisemise rakumassi moodustavad ainult normaalsed rakud. Defektide parandamine taastab liigi spetsiifilise kromosoomide arvu, aga võib viia rakkude vahelise varieeruvuseni, kuna monosoomia puhul läheb kaotsi ühelt vanemalt saadud kromosoom, teiselt vanemalt saadud kromosoom esineb aga kahe koopiana – normaalsetes rakkudes esinevad mõlemalt vanemalt päritud kromosoomid. Kuigi eneseerandamise fenomeni on kirjeldatud, puuduvad siiski usaldusväärsed andmed selle mehhanismide käivitumise tingimuste kohta.

Andmete puudumine paljude blastomeeride kohta on limiteerivaks asjaoluks, mis jätab erinevad võimalused tulemuste interpreteerimisel ja järelduste tegemisel.

Inimese kromosomaalsete aberratsioonide uurimine piirdub IVF tsüklitest saadud munarakkudega ja varajaste embrüotega. Enamik olid kasutuselt kõrvaldatud geneetiliste defektide, kehva morfoloogia või üle kahe pronukleuse esinemise tõttu (Evsikov ja Verlinsky, 1998). See tähendab, et juba algselt ei ole uuritavad embrüod väga hea kvaliteediga ja nendes esinevad mõningad defektid. Katseid normaalselt arenevate embrüotega teostatakse enamasti ühe (lõigustumise staadiumis) või mitme (blastotsüsti staadiumis) raku põhjal, kuna neid kasutatakse emakasse siirdamiseks IVF käigus ning paljude rakkude analüüs hävitaks embrüot. Sellised katsed on aga, nagu eespool mainitud, võimalikud ainult IVF tsükli saadud embrüotega ja ei ole täpselt teada, mis toimub *in vivo*. Sellised uuringud on seotud eetiliste piirangutega.

Veise embrüote kromosomaalse ebastabiilsuse uurimine annab sarnaseid tulemusi defektide kohta ning samuti võimaldab uurida nii *in vitro* kui ka *in vivo* tingimustes saadud embrüoid ilma eetiliste piiranguteta. Uuringud on näidanud, et kuigi veise genoomis on 60 kromosoomi, on see siiski organisatsiooni poolest lähedam inimese genoomile kui näiteks hiire genoom (Everts-van der Wind *et al.*, 2005). See tähendab, et veist saab kasutada mudelina selliste arengubioloogiliste nähtuste uurimisel ja teha saadud tulemustest üldistust ka inimese embrüogeneesi kohta. Need teadmised oleks võimalik kasutada ennekõike IVF efektiivsuse parandamiseks.

IVF edukuse suurendamiseks kasutatakse PGS-i. Vaatamata sellele ei ole praeguseks teostatud piisavalt kliinilisi uuringuid, mis tõestaksid selle meetodi kasulikkust. PGS-i jaoks on tänapäevaks välja arendatud efektiivsed 24-kromosoomi analüüsimeetodid, mis põhinevad DNA mikrokiiptel või teise põlvkonna sekveneerimisel. Need meetodid on täpsemad kui traditsiooniline FISH, aga ka nende kasutamine ei kindlusta normaalse embrüo välja valimist võimaliku mosaiiksuse tõttu. Analüüsitud normaalne rakk võib pärineda kromosoomiarvupatoloogiatega embrüost ja vastupidi – analüüsitud aneuploidne rakk võib pärineda embrüost, kus enamik rakke on diploidsed ja ilma patoloogiatega. Samuti ei ole kokkuleppele jõutud, milline biopsia tüüp on kõige parem analüüsiks, kuna kõikidel on oma eelised ja puudused. Seega võib järeldada, et PGS tehnoloogia vajab edasi arendamist enne kui seda saab laialdaselt kasutada preimplantatsiooniliste embrüote kvaliteedi hindamisel.



## KOKKUVÕTE

IVF on üks parimaid viljatuse ravimise meetodeid, kuigi selle efektiivsus on suhteliselt madal inimese varajastes embrüotes esineva kromosomaalse ebastabiilsuse tõttu. Kromosoomide aberratsioonid preimplantatsioonilistes embrüotes uuritakse juba mitu aastat, et kasutada saadud teadmisi IVF edukuse suurendamiseks. Käesolevas töös uuriti kromosomaalset ebastabiilsust varajastes veise embrüotes ühe raku tasemel.

Kolme 8-rakulises staadiumis oleva embrüo analüüsiks õnnestus MDA meetodiga amplifitseerida 65% blastomeeridest. Seega ei ole MDA kõige efektiivsem meetod kogu-genoomi amplifikatsiooniks. Selle meetodi oluliseks puuduseks on alleeli väljalangemine, mistõttu analüüsi käigus võivad esineda artefaktid ehk vale-positiivsed tulemused. Sellisel juhul ei pruugi näiline deletsioon või duplikatsioon olla tõeline kromosoomi defekt, vaid MDA tagajärg. Lisaks sellele, kiibiandmed on ühe raku analüüsil keskmiselt kehvemad madala kvaliteedi tõttu. Kõik need asjaolud raskendavad tulemuste interpreteerimist, seetõttu keskenduti edasisel kiibianalüüsil suurte kromosomaalsete aberratsioonide leidmisele, kuna väikeste aberratsioonide kindlaks tegemine nõuab täiendavaid analüüse.

Kolmest embrüost ühe embrüo kõik analüüsitud blastomeerid olid diploidsed ja ilma patoloogiateta. Kuna suurema osa rakkude kohta kiibiandmed puuduvad, siis ei saanud kindel olla, et tegemist ei olnud mosaiikse embrüoga. Ülejäänud kaks embrüot olid mosaiiksed, nendest ühes olid ainult aneuploidsed blastomeerid ning teises nii aneuploidsed kui ka diploidsed blastomeerid. Kromosomaalsete aberratsioonidega embrüote esinemissagedus oli vastavuses varasemate uuringutega ning näitas, et lõigustumise staadiumis on kromosoomidefektid üsna sagedased.

Mõnede blastomeeride puhul lahkesid PCR ja kiibianalüüsi andmed X- ja Y-kromosoomide suhtes. See on tingitud vastavate kromosoomide mikrosatelliitsete piirkondade esinemisest. 6. kromosoomi piirkond on ka kordusjärjestuste rikas, aga antud juhul ei olnud tegemist mikrosatelliit praimeriga ning probleeme amplifikatsiooniga ei esinenud. Seega mikrosatelliitsete praimerite kasutamine ei ole soovitatav MDA produkti kontrollimiseks. Antud uuringu käigus leitud kromosomaalsed aberratsioonid esinevad ka inimese varajastes embrüotes sarnase sagedusega. Veiste embrüote uurimine ei ole aga seotud eetiliste piirangutega nagu see on inimese puhul ning võimaldab saada andmeid nii *in vitro* kui ka *in vivo* arenevatest embrüotest. See võimaldab kasutada veist kui mudelit selliste nähtuste uurimisel. Saadud teadmisi oleks võimalik kasutada inimese IVF edukuse tõstmiseks.

# **CHROMOSOME INSTABILITY IN EARLY BOVINE EMBRYOS**

Julia Bokajeva

## **SUMMARY**

Despite the fact that IVF is a widely used infertility treatment, the effectiveness of the procedure is relatively low due to the high rate of chromosome instability found in the early human embryos. Research could give insight into the causes of chromosomal aberrations in human preimplantation embryos. Experimenting on human embryos, especially naturally developing, however, is associated with ethical issues. There is also too little data on the embryos of other mammalian species. Therefore it is unclear whether the rate of chromosome instability present in human preimplantation embryos is similar to the rate present in other species.

In this thesis, chromosome instability was studied in early bovine embryos on a single cell level. Blastomeres' genome was amplified using the MDA method and showed a success rate of 65%. It was thus concluded that MDA is not the best method for whole genome amplification, although there is no better method at this point. Taking into account the limitations of both MDA, such as ADO, and the subsequent SNP array, such as lower quality data when analyzing a single cell, it was decided to focus on large chromosomal aberrations, because the accurate identification of the little ones requires additional analysis.

Only one out of three embryos showed diploidy in all analyzed blastomeres. However, data on the majority of blastomeres was absent due to different complications, which leaves the chance that the embryo was not entirely diploid. The other two embryos were mosaic. One of them contained only aneuploid blastomeres, whereas the other one contained both diploid and aneuploid cells. The frequency of occurrence of embryos with chromosomal aberrations was compliant with previously performed studies and showed that cleave stage embryos are prone to chromosomal defects.

There was a mismatch in PCR and SNP array results considering X- and Y-chromosomes in certain blastomeres due to microsatellite regions. 6th chromosome was also rich in repeats, although the primers used for amplification with PCR did not contain mikrosatellites so the

amplification was successful. Therefore using microsatellite primers to check the MDA product quality is not recommended as it may give false-positive results.

Chromosome instability found in this study occurs at the similar rate in early human embryos. Experimenting on bovine embryos is not associated with ethical issues and enables to get data from both *in vitro* and *in vivo* developing embryos. This allows the use of cattle as a model organism in the studies of such phenomenon. Data acquired from such studies could be primarily used to raise the success rate of human IVF.

## **TÄNUAVALDUSED**

Tahan tänada oma juhendajaid Olga Tšuiko ja Ants Kurg'e antud võimaluse eest uurida elu selle kõige varasemas staadiumis ning nende toetuse, julgustamise ja nõuannete eest.

Avaldan tänu ka Eesti Maaülikooli prof. Ülle Jaakma töögrupile ja Leuveni Katoliku Ülikooli prof. Joris Vermeesch töögrupile, kes osalesid antud töös kirjeldatud uurimuses.

# KASUTATUD KIRJANDUS

## Artiklid

- Allan J., Edirisinghe R., Anderson J., Jemmott R., Nandini A. V., Gattas M. (2004). *Dilemmas encountered with preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos*. Aust N Z J Obstet Gynaecol 44(2): 117-123.
- ASRM Practice Committee (2008). *Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion*. Fertil Steril 90(5 Suppl): S136-143.
- Austin C. R. (1991). *Bob Edwards--a profile*. Hum Reprod 6(1): 1-4.
- Barbash-Hazan S., Frumkin T., Malcov M., Yaron Y., Cohen T., Azem F., Amit A., Ben-Yosef D. (2009). *Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential*. Fertil Steril 92(3): 890-896.
- Beck-Fruchter R., Lavee M., Weiss A., Geslevich Y., Shalev E. (2014). *Rescue intracytoplasmic sperm injection: a systematic review*. Fertil Steril 101(3): 690-698.
- Benkhalifa M., Kasakyan S., Clement P., Baldi M., Tachdjian G., Demirel A., Gurgan T., Fiorentino F., Mohammed M., Qumsiyeh M. B. (2005). *Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro*. Prenat Diagn 25(10): 894-900.
- Brezina P. R., Brezina D. S., Kearns W. G. (2012). *Preimplantation genetic testing*. BMJ 345: e5908.
- Burgoyne P. S., Holland K., Stephens R. (1991). *Incidence of numerical chromosome anomalies in human pregnancy estimation from induced and spontaneous abortion data*. Hum Reprod 6(4): 555-565.
- Capalbo A., Bono S., Spizzichino L., Biricik A., Baldi M., Colamaria S., Ubaldi F. M., Rienzi L., Fiorentino F. (2013). *Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development*. Hum Reprod 28(2): 509-518.
- Christopikou D., Tsorva E., Economou K., Shelley P., Davies S., Mastrominas M., Handyside A. H. (2013). *Polar body analysis by array comparative genomic hybridization accurately predicts aneuploidies of maternal meiotic origin in cleavage stage embryos of women of advanced maternal age*. Hum Reprod 28(5): 1426-1434.

- Coonen E., Hopman A. H., Geraedts J. P., Ramaekers F. C. (1998). *Application of in-situ hybridization techniques to study human preimplantation embryos: a review*. Hum Reprod Update 4(2): 135-152.
- Coppola G., Alexander B., Di Berardino D., St John E., Basrur P. K., King W. A. (2007). *Use of cross-species in-situ hybridization (ZOO-FISH) to assess chromosome abnormalities in day-6 in-vivo- or in-vitro-produced sheep embryos*. Chromosome Res 15(3): 399-408.
- De Sousa P. A., Watson A. J., Schultz G. A., Bilodeau-Goeseels S. (1998). *Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review*. Mol Reprod Dev 51(1): 112-121.
- Elsik C. G., Tellam R. L., Worley K. C., Gibbs R. A., Muzny D. M., Weinstock G. M., Adelson D. L., Eichler E. E., Elnitski L., Guigo R., Hamernik D. L., Kappes S. M., Lewin H. A., Lynn D. J., Nicholas F. W., Raymond A., Rijkels M., Skow L. C., Zdobnov E. M., Schook L., Womack J., Alioto T., Antonarakis S. E., Astashyn A., Chapple C. E., Chen H. C., Chrast J., Camara F., Ermolaeva O., Henrichsen C. N., Hlavina W., Kapustin Y., Kiryutin B., Kitts P., Kokocinski F., Landrum M., Maglott D., Pruitt K., Sapojnikov V., Searle S. M., Solovyev V., Souvorov A., Ucla C., Wyss C., Anzola J. M., Gerlach D., Elhaik E., Graur D., Reese J. T., Edgar R. C., McEwan J. C., Payne G. M., Raison J. M., Junier T., Kriventseva E. V., Eyraas E., Plass M., Donthu R., Larkin D. M., Reecy J., Yang M. Q., Chen L., Cheng Z., Chitko-McKown C. G., Liu G. E., Matukumalli L. K., Song J., Zhu B., Bradley D. G., Brinkman F. S., Lau L. P., Whiteside M. D., Walker A., Wheeler T. T., Casey T., German J. B., Lemay D. G., Maqbool N. J., Molenaar A. J., Seo S., Stothard P., Baldwin C. L., Baxter R., Brinkmeyer-Langford C. L., Brown W. C., Childers C. P., Connelley T., Ellis S. A., Fritz K., Glass E. J., Herzig C. T., Iivanainen A., Lahmers K. K., Bennett A. K., Dickens C. M., Gilbert J. G., Hagen D. E., Salih H., Aerts J., Caetano A. R., *et al.* (2009). *The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution*. Science 324(5926): 522-528.
- Everts-van der Wind A., Larkin D. M., Green C. A., Elliott J. S., Olmstead C. A., Chiu R., Schein J. E., Marra M. A., Womack J. E., Lewin H. A. (2005). *A high-resolution whole-genome cattle-human comparative map reveals details of mammalian chromosome evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A 102(51): 18526-18531.
- Evsikov S., Verlinsky Y. (1998). *Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts*. Hum Reprod 13(11): 3151-3155.

- Farin P. W., Farin C. E. (1995). *Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development*. Biol Reprod 52(3): 676-682.
- Fiorentino F., Biricik A., Bono S., Spizzichino L., Cotroneo E., Cottone G., Kokocinski F., Michel C. E. (2014). *Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos*. Fertil Steril 101(5): 1375-1382 e1372.
- Fritz B., Hallermann C., Olert J., Fuchs B., Bruns M., Aslan M., Schmidt S., Coerdts W., Muntefering H., Rehder H. (2001). *Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)-Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions*. Eur J Hum Genet 9(7): 539-547.
- Frumkin T., Malcov M., Yaron Y., Ben-Yosef D. (2008). *Elucidating the origin of chromosomal aberrations in IVF embryos by preimplantation genetic analysis*. Mol Cell Endocrinol 282(1-2): 112-119.
- Gardner D. K., Vella P., Lane M., Wagley L., Schlenker T., Schoolcraft W. B. (1998). *Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers*. Fertil Steril 69(1): 84-88.
- Geigl J. B., Obenauf A. C., Schwarzbraun T., Speicher M. R. (2008). *Defining 'chromosomal instability'*. Trends Genet 24(2): 64-69.
- Goossens V., Traeger-Synodinos J., Coonen E., De Rycke M., Moutou C., Pehlivan T., Derks-Smeets I. A., Harton G. (2012). *ESHRE PGD Consortium data collection XI: cycles from January to December 2008 with pregnancy follow-up to October 2009*. Hum Reprod 27(7): 1887-1911.
- Granne I., Child T., Hartshorne G. (2008). *Embryo cryopreservation: evidence for practice*. Hum Fertil (Camb) 11(3): 159-172.
- Gutierrez-Mateo C., Colls P., Sanchez-Garcia J., Escudero T., Prates R., Ketterson K., Wells D., Munne S. (2011). *Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos*. Fertil Steril 95(3): 953-958.
- Handyside A. H. (2013). *24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies*. Fertil Steril 100(3): 595-602.
- Handyside A. H., Delhanty J. D. (1997). *Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprises*. Trends Genet 13(7): 270-275.
- Handyside A. H., Kontogianni E. H., Hardy K., Winston R. M. (1990). *Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification*. Nature 344(6268): 768-770.

- Harper J. C., Sengupta S. B. (2012). *Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011*. Hum Genet 131(2): 175-186.
- Harper J. C., Wilton L., Traeger-Synodinos J., Goossens V., Moutou C., SenGupta S. B., Pehlivan Budak T., Renwick P., De Rycke M., Geraedts J. P., Harton G. (2012). *The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection*. Hum Reprod Update 18(3): 234-247.
- Harton G. L., Magli M. C., Lundin K., Montag M., Lemmen J., Harper J. C. (2011). *ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group--best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS)*. Hum Reprod 26(1): 41-46.
- Hassold T., Chen N., Funkhouser J., Jooss T., Manuel B., Matsuura J., Matsuyama A., Wilson C., Yamane J. A., Jacobs P. A. (1980). *A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions*. Ann Hum Genet 44(Pt 2): 151-178.
- Hassold T., Hunt P. (2001). *To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy*. Nat Rev Genet 2(4): 280-291.
- Heyman Y., Chavatte-Palmer P., LeBourhis D., Camous S., Vignon X., Renard J. P. (2002). *Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos*. Biol Reprod 66(1): 6-13.
- Holm P., Shukri N. N., Vajta G., Booth P., Bendixen C., Callesen H. (1998). *Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex*. Theriogenology 50(8): 1285-1299.
- James R. M., Klerkx A. H., Keighren M., Flockhart J. H., West J. D. (1995). *Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid $\Rightarrow$ diploid chimaeras*. Dev Biol 167(1): 213-226.
- Jones H. W., Jr. (2008). *The use of controlled ovarian hyperstimulation (COH) in clinical in vitro fertilization: the role of Georgeanna Seegar Jones*. Fertil Steril 90(5): e1-3.
- Juriscova A., Varmuza S., Casper R. F. (1996). *Programmed cell death and human embryo fragmentation*. Mol Hum Reprod 2(2): 93-98.
- Kirkegaard K., Agerholm I. E., Ingerslev H. J. (2012). *Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment*. Hum Reprod 27(5): 1277-1285.
- Kuliev A., Cieslak J., Ilkevitch Y., Verlinsky Y. (2003). *Chromosomal abnormalities in a series of 6,733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies*. Reprod Biomed Online 6(1): 54-59.



- Lechniak D., Switonski M., Sosnowski M. (1996). *The incidence of bovine diploid oocytes matured in vitro*. Theriogenology 46(2): 267-277.
- Ledger W. L., Anumba D., Marlow N., Thomas C. M., Wilson E. C. (2006). *The costs to the NHS of multiple births after IVF treatment in the UK*. BJOG 113(1): 21-25.
- Li G. P., Liu Y., White K. L., Bunch T. D. (2005a). *Cytogenetic analysis of diploidy in cloned bovine embryos using an improved air-dry karyotyping method*. Theriogenology 63(9): 2434-2444.
- Li M., DeUgarte C. M., Surrey M., Danzer H., DeCherney A., Hill D. L. (2005b). *Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3*. Fertil Steril 84(5): 1395-1400.
- Loutradi K. E., Kolibianakis E. M., Venetis C. A., Papanikolaou E. G., Pados G., Bontis I., Tarlatzis B. C. (2008). *Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis*. Fertil Steril 90(1): 186-193.
- Macaulay I. C., Voet T. (2014). *Single cell genomics: advances and future perspectives*. PLoS Genet 10(1): e1004126.
- Macklon N. S., Geraedts J. P., Fauser B. C. (2002). *Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss*. Hum Reprod Update 8(4): 333-343.
- Macklon N. S., Stouffer R. L., Giudice L. C., Fauser B. C. (2006). *The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization*. Endocr Rev 27(2): 170-207.
- Magli M. C., Gianaroli L., Ferraretti A. P., Lappi M., Ruberti A., Farfalli V. (2007). *Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement*. Fertil Steril 87(3): 534-541.
- Mantikou E., Wong K. M., Repping S., Mastenbroek S. (2012). *Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos*. Biochim Biophys Acta 1822(12): 1921-1930.
- Mastenbroek S., Twisk M., van der Veen F., Repping S. (2011). *Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs*. Hum Reprod Update 17(4): 454-466.
- Mertzanidou A., Wilton L., Cheng J., Spits C., Vanneste E., Moreau Y., Vermeesch J. R., Sermon K. (2013). *Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos*. Hum Reprod 28(1): 256-264.
- Nagaoka S. I., Hassold T. J., Hunt P. A. (2012). *Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem*. Nat Rev Genet 13(7): 493-504.

- Ombelet W., Cooke I., Dyer S., Serour G., Devroey P. (2008). *Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries*. Hum Reprod Update 14(6): 605-621.
- Plachot M., Junca A. M., Mandelbaum J., de Grouchy J., Salat-Baroux J., Cohen J. (1987). *Chromosome investigations in early life. II. Human preimplantation embryos*. Hum Reprod 2(1): 29-35.
- Quaas A., Dokras A. (2008). *Diagnosis and treatment of unexplained infertility*. Rev Obstet Gynecol 1(2): 69-76.
- Reindollar R. H., Regan M. M., Neumann P. J., Levine B. S., Thornton K. L., Alper M. M., Goldman M. B. (2010). *A randomized clinical trial to evaluate optimal treatment for unexplained infertility: the fast track and standard treatment (FASTT) trial*. Fertil Steril 94(3): 888-899.
- Renwick P. J., Lewis C. M., Abbs S., Ogilvie C. M. (2007). *Determination of the genetic status of cleavage-stage human embryos by microsatellite marker analysis following multiple displacement amplification*. Prenat Diagn 27(3): 206-215.
- Robberecht C., Vanneste E., Pexsters A., D'Hooghe T., Voet T., Vermeesch J. R. (2010). *Somatic genomic variations in early human prenatal development*. Curr Genomics 11(6): 397-401.
- Sakkas D., Percival G., D'Arcy Y., Sharif K., Afnan M. (2001). *Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection*. Fertil Steril 76(6): 1150-1156.
- Sakkas D., Shoukir Y., Chardonens D., Bianchi P. G., Campana A. (1998). *Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability*. Hum Reprod 13(1): 182-187.
- Schumacher A., Kesdogan J., Fischer B. (1998). *DNA ploidy abnormalities in rabbit preimplantation embryos are not increased by conditions associated with in vitro culture*. Mol Reprod Dev 50(1): 30-34.
- Scott R. T., Jr., Ferry K., Su J., Tao X., Scott K., Treff N. R. (2012). *Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective, blinded, nonselection study*. Fertil Steril 97(4): 870-875.
- Zhao Y., Brezina P., Hsu C. C., Garcia J., Brinsden P. R., Wallach E. (2011). *In vitro fertilization: four decades of reflections and promises*. Biochim Biophys Acta 1810(9): 843-852.

- Ziebe S., Lundin K., Loft A., Bergh C., Nyboe Andersen A., Selleskog U., Nielsen D., Grondahl C., Kim H., Arce J. C. (2003). *FISH analysis for chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X and Y in all blastomeres of IVF pre-embryos from 144 randomly selected donated human oocytes and impact on pre-embryo morphology*. Hum Reprod 18(12): 2575-2581.
- Treff N. R., Northrop L. E., Kasabwala K., Su J., Levy B., Scott R. T., Jr. (2011). *Single nucleotide polymorphism microarray-based concurrent screening of 24-chromosome aneuploidy and unbalanced translocations in preimplantation human embryos*. Fertil Steril 95(5): 1606-1612 e1601-1602.
- Van der Aa N., Esteki M. Z., Vermeesch J. R., Voet T. (2013). *Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics*. Genome Med 5(8): 71.
- Wang S. X. (2011). *The past, present, and future of embryo selection in in vitro fertilization: Frontiers in Reproduction Conference*. Yale J Biol Med 84(4): 487-490.
- Vanneste E., Melotte C., Voet T., Robberecht C., Debrock S., Pexsters A., Staessen C., Tomassetti C., Legius E., D'Hooghe T., Vermeesch J. R. (2011). *PGD for a complex chromosomal rearrangement by array comparative genomic hybridization*. Hum Reprod 26(4): 941-949.
- Vanneste E., Voet T., Le Caignec C., Ampe M., Konings P., Melotte C., Debrock S., Amyere M., Vikkula M., Schuit F., Fryns J. P., Verbeke G., D'Hooghe T., Moreau Y., Vermeesch J. R. (2009). *Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos*. Nat Med 15(5): 577-583.
- Weier H. U., Munne S., Fung J. (1999). *Patient-specific probes for preimplantation genetic diagnosis of structural and numerical aberrations in interphase cells*. J Assist Reprod Genet 16(4): 182-191.
- Vitek W. S., Galarraga O., Klatsky P. C., Robins J. C., Carson S. A., Blazar A. S. (2013). *Management of the first in vitro fertilization cycle for unexplained infertility: a cost-effectiveness analysis of split in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril 100(5): 1381-1388.
- Viuff D., Greve T., Avery B., Hyttel P., Brockhoff P. B., Thomsen P. D. (2000). *Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination*. Biol Reprod 63(4): 1143-1148.
- Viuff D., Rickords L., Offenbergh H., Hyttel P., Avery B., Greve T., Olsaker I., Williams J. L., Callesen H., Thomsen P. D. (1999). *A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid*. Biol Reprod 60(6): 1273-1278.

- Yadav B. R., King W. A., Betteridge K. J. (1993). *Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated in vitro*. Mol Reprod Dev 36(4): 434-439.
- Yang Z., Liu J., Collins G. S., Salem S. A., Liu X., Lyle S. S., Peck A. C., Sills E. S., Salem R. D. (2012). *Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study*. Mol Cytogenet 5(1): 24.

## **Kataloogid**

- Illumina (2014). *Preimplantation Genetics Publications*. Pub 1570-2014-43.
- Schinzel A. 2001. *Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man*. Walter de Gruyter, New York.

## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

<http://nccd.cdc.gov/> (20.05.2014)

<http://www.qiagen.com/> (20.05.2014)

# LISA

**Tabel 3. PCR-ks kasutatud praimerid.**

Kromosoom	Praimer	Järjestus
6	<i>Forward</i>	CTTCTGGGAGTCTGGGAGTG
	<i>Reverse</i>	CTTGGAAC TTTGGCCTTGAG
X	<i>Forward</i>	CATACAGGGATGGAGGAGGC
	<i>Reverse</i>	AGGGTCTTCTTTTCGTCCTTTC
Y	<i>Forward</i>	CAACCAGTATCTGTATGCCT
	<i>Reverse</i>	AAACATACGCAACAATCTGCT

# LIHTLITSENTS

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Julia Bokajeva (05.12.1991.),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**Kromosomaalne ebastabiilsus veise varajastes embrüotes,**

mille juhendajad on Olga Tšuiko ja Ants Kurg,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2014.